

**Untersuchungen zur Dünnschichtchromatografie
saurer Mucopolysaccharide
bei Kindern mit Mucopolysaccharidosen**

Hans Erich Rosenbeck

1973

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. SPIESS

UNTERSUCHUNGEN ZUR
DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE
SAURER MUCOPOLYSACCHARIDE
BEI KINDERN MIT MUCOPOLYSACCHARIDOLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Erich Rosenbeck
aus München

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. -Doz. Dr. H. -J. SUSCHKE
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. SPIESS
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1973



INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	5
II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	8
1. Problemstellung	8
2. Material und Methode	9
a) Dünnschichtchromatografie	9
b) Enzymatischer Abbau	17
3. Ergebnisse	19
4. Diskussion	31
III. ZUSAMMENFASSUNG	35
IV. LITERATURVERZEICHNIS	36

I. EINLEITUNG

Solange es für viele erbliche Stoffwechselkrankheiten in der Pädiatrie kaum geeignete Therapiemöglichkeiten gibt, kann ihre Diagnostik zunächst eher von theoretischem Interesse sein. Jedoch hängt das weitere Schicksal der erkrankten Kinder entscheidend von einer möglichst frühzeitigen Erkennung ab.

Im Falle der Mucopolysaccharidosen handelt es sich um eine Krankheitsgruppe, die durch Stoffwechselanomalien der sauren Mucopolysaccharide (sMPS) charakterisiert ist. Klinik, Biochemie und Erbgang einiger Syndrome sind in Tabelle 1 angeführt.

Neuere Untersuchungsergebnisse lassen darauf schliessen, dass bei den meisten dieser Krankheiten ein mangelhafter Abbau insbesondere von Dermatansulfat und Heparansulfat, mit daraus resultierender Speicherung unvollständig abgebauter Produkte in Lysosomen besteht. Der pathogenetische Zusammenhang der dabei beobachteten erhöhten Ausscheidung von sMPS im Urin ist im einzelnen nicht bekannt. Das Verteilungsmuster der Urin - MPS leistet jedoch einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung einzelner Mucopolysaccharidosetypen.

Voraussetzung dazu ist ein geeignetes analytisches Verfahren zur qualitativen Erfassung der Urin - MPS. In den letzten Jahren sind viele Methoden entwickelt und beschrieben worden, die sich mit dem Nachweis, der Auftrennung, Bestimmung und Charakterisierung dieser Stoffgruppe befassen. Darunter nehmen die dünn-schichtchromatografischen (dc) Methoden in der Reihe der klinisch-chemischen Unter-

TABELLE I

Die Mucopolysaccharidosen und verwandte Störungen nach DORFMAN (8)

Krankheit	Klinische Merkmale	Biochemische Befunde	Erbgang
HURLER-Syndrom, Mucopolysaccharidose I	Schweres geistiges Zurückbleiben, Skelettdeformitäten, starke Hornhauttrübung, erhebliche somatische Veränderungen.	Dermatansulfat und Heparansulfat in Urin und Geweben, Dermatansulfat in Fibroblasten. Erhöhter Gehalt an Gangliosiden im Gehirn. Fehlen der α -L-Iduronidase.	Autosomal-rezessiv
HUNTER-Syndrom, Mucopolysaccharidose II	Mäßiges geistiges Zurückbleiben, erhebliche Deformitäten des Skeletts, keine Hornhauttrübung, frühe Taubheit, beträchtliche somatische Veränderungen.	Dermatansulfat und Heparansulfat in Urin und Geweben, Dermatansulfat in Fibroblasten. Erhöhter Gehalt an Gangliosiden im Gehirn.	X-gekoppelt-rezessiv
SANFILIPPO-A-Syndrom, Mucopolysaccharidose III	Schweres geistiges Zurückbleiben, nur geringe Veränderungen am Skelett, Hornhauttrübung fraglich.	Heparansulfat in Urin und Geweben. Verminderte Sulfamidase (?).	Autosomal-rezessiv
SANFILIPPO-B-Syndrom	Schweres geistiges Zurückbleiben, geringe Veränderungen am Skelett, Hornhauttrübung fraglich.	Heparansulfat in Urin und Geweben. Fehlen der α -N-Acetylhexosaminidase.	Autosomal-rezessiv
MORQUIO-Syndrom, Mucopolysaccharidose IV	Schwere Deformitäten des Skeletts, beträchtliche spondylo-epiphysäre Dysplasie, kein geistiges Zurückbleiben. Hornhauttrübungen können auftreten.	Keratansulfat und Chondroitin-4- und Chondroitin-6-sulfat im Urin.	Autosomal-rezessiv
SCHEIE-Syndrom (ÜLLRICH-SCHEIE-Syndrom, Spät-HURLER), Mucopolysaccharidose V	Geringe Veränderungen des Skeletts, kein geistiges Zurückbleiben, schwere Hornhauttrübungen.	Dermatansulfat im Urin. Fehlen der α -L-Iduronidase.	Autosomal-rezessiv
MARTEAUX-LAMY-Syndrom, Mucopolysaccharidose VI	Schwere Deformitäten des Skeletts, schwere Hornhauttrübung, kein geistiges Zurückbleiben.	Dermatansulfat im Urin.	Autosomal-rezessiv
«I-CELL»-Krankheit, Variante des HURLER-Syndroms	Schweres geistiges Zurückbleiben, Deformitäten des Skeletts.	Zunahme der Mucopolysaccharide im Urin variabel. Dermatansulfat in Fibroblasten. Erhöhter Lipidgehalt der Fibroblasten. Verminderter Gehalt an verschiedenen lysosomalen Enzymen in Fibroblasten.	Autosomal-rezessiv
Lipomucopolysaccharidose, Galactosidase- β -positive Krankheit	Schweres geistiges Zurückbleiben und Deformitäten des Skeletts. Hornhauttrübung.	Keine Erhöhung der Mucopolysaccharide im Urin. Erhöhung des Mucopolysaccharid- und Lipidgehalts in Geweben (histochemisch).	?
Mucopolysaccharidose VII	Skelettbefunde ähnlich wie beim MORQUIO-Syndrom.	Ergebnisse lassen keine Schlüsse zu.	?
Gangliosidose G_{M1} , neuroviszerale Lipidose	Frühe geistige Retardation (kann auch später auftreten). Starke Veränderungen am Skelett.	Keratansulfat-ähnliches Material in Geweben und Urin. β -Galactosidase in den Geweben sehr niedrig.	Autosomal-rezessiv

suchungsmethoden einen breiten Raum ein (z.B. 1, 13, 16, 31, 33).

Im Hinblick auf andere übliche MPS-Bestimmungsmethoden besteht die Dünnschichtchromatografie (DC) - abgesehen von den bekannten Vorzügen der Schnelligkeit der Auftrennung von Substanzgemischen, des geringen Substanzbedarfs und der hohen Trennleistung - hier hauptsächlich durch ihren geringen apparativen Aufwand. Dieser Vorteil der guten Leistung mit geringen Mitteln trifft für die qualitative Anwendung der DC im allgemeinen ohne Einschränkung zu.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. PROBLEMSTELLUNG

Aufgabe vorliegender Arbeit sollte es sein, zwei verschiedene, in der Literatur beschriebene dc Verfahren auf ihre Anwendungsmöglichkeit bei der Auftrennung verschiedener sMPS-Gemische kritisch zu prüfen. Ein Verfahren sollte dann für die klinische Routineuntersuchung geeignet sein, um den spezifischen qualitativen Nachweis dieser Stoffe zu ermöglichen.

Unter diesen Überlegungen konzentrierten sich im folgenden die Untersuchungen auf die 1967 von MARZULLO und LASH (16) angegebene Kieselgel-DC, von der vor allem ausreichende Trennergebnisse bei kurzer Laufzeit und die Anwendungsmöglichkeit aggressiver Sprühreagenzien zur selektiven MPS-Detektion erwartet wurden. Daneben sollte das 1969 von TELLER und ZIEMANN (31) beschriebene Trennverfahren auf Cellulosedünnschichtplatten seine Leistungsfähigkeit für klinische Zwecke bestätigen.

Wie im Verlauf dieser Untersuchungen ausgeführt wird, war es nicht möglich, ein Gemisch dieser Verbindungsklasse dc allein exakt zu charakterisieren. Die Beschäftigung mit der Frage, inwieweit durch eine Kombination von DC und enzymatischer Analyse eine Lösung dieses Problems erreicht werden konnte, stand somit für einen weiteren Teil dieser Arbeit im Vordergrund.

2. MATERIAL UND METHODE

a) Dünnschichtchromatografie

Der Trennung von sMPS auf dünnen Schichten liegt das Prinzip der Verteilungschromatografie zugrunde. Über eine an ein geeignetes Trägermaterial gebundene flüssige Phase (stationäre Phase) wandert das Laufmittel (mobile Phase) hinweg und führt dabei die zu trennenden Substanzen mit. Diese verteilen sich zwischen den beiden Phasen nach dem NERNSTschen Verteilungsgesetz. Für die Wanderungsgeschwindigkeit ist der Verteilungskoeffizient massgebend (21).

Als Mass für die Wanderungsgeschwindigkeit der Substanzen dient der Rf-Wert. Dieser wird durch die Beziehung

$$R_f = \frac{\text{Entfernung der Substanz vom Start}}{\text{Entfernung der Laufmittelfront vom Start}}$$

ausgedrückt (2, 14, 21, 28).

Als Untersuchungsmaterial für die DC dienten MPS-Vergleichssubstanzen, MPS-haltige Gewebsextrakte aus Knorpel und Urinproben von an Mucopolysaccharidosen erkrankten Patienten. Eine Übersicht über die MPS-Referenz- und Testsubstanzen zeigt Tabelle 2 (s. S.10).

Mit Ausnahme des Knorpelextraktes und des Elektrophoresestandards stellten diese Substanzen auch das Ausgangsmaterial für den enzymatischen Abbau und die daran anschliessende DC dar.

Zur Untersuchung der in den Urinproben enthaltenen MPS wurde zunächst der Gesamt-MPS-Gehalt des 24 Stunden Urins in I. E. des Heparinstandardpräparates festgestellt (29).

100 ml davon wurden 24 Std. lang gegen Wasser dialysiert und das Dia-

TABELLE II

Test- und Referenzsubstanzen zur DC

Substanz	dc Bez.	Herkunft
Hyaluronsäure-K ⁺ -Salz	HA	SERVA, Heidelberg
Keratansulfat	KS	Dr. BLECKMANN, Berlin
Chondroitin-6-Sulfat	CSC	MILES Lab., Kankakee
Chondroitin-4-Sulfat	CSA	MILES Lab., Kankakee
Chondroitinsulfat B	CSB	SEIKAGAKU, Tokio
Dermatansulfat	DS	Dr. KRESSE, Münster
Heparansulfat	HS	Dr. KRESSE, Münster
Knorpel-Extrakt	Kn	Finger, human
Elpho-Standard 1971	St	HA + DS + CSA + CSC
Urin-Eluat V	V	Typ III, ♀, 3 Jhr.
Urin-Eluat W	W	Typ I, ♀, 5 Jhr.
Urin-Eluat Vo	Vo	Typ III, ♂, 3 Jhr.
Urin-Eluat Rö	Rö	Typ II, ♂, 19 Jahre
Urin-Eluat Ne	Ne	Typ I, ♀, 4 Jhr.
Urin-Eluat Vr	Vr	Typ IV, ♂, 4 Jhr.

lysat lyophilisiert. Durch Verdünnen mit Wasser wurden zum Gebrauch Lösungen hergestellt, die je 100 µg MPS in 1 ml enthielten.

Bei den Gewebeproben wurde nach mechanischer Aufbereitung und Entfetten mit Petroläther analog verfahren.

Der Berechnung wurde der internationale Heparinstandard zugrunde gelegt, wonach 1 I. E. 7,7 µg MPS entspricht (22).

Die übrigen Substanzproben kamen in etwa 1 %-iger wässriger Lösung zur Verwendung.

Die allgemeine Verfahrenstechnik der DC umfasst folgende Arbeitsgänge:

1. Auswahl und Vorbereitung des Sorptionsmittels und des Sorptionsmittelträgers,
2. Auswahl und Vorbereitung der Trennkammer und des Laufmittels,
3. Auftragen des gelösten oder suspendierten Adsorbendums,
4. Trennung,
5. Detektion,
6. Dokumentation.

Für die Untersuchungen wurden handelsübliche Fertigplatten verwendet, da diese gegenüber selbst gegossenen DC-Platten, abgesehen von den relativ hohen Kosten, einige nicht zu unterschätzende Vorteile aufweisen:

Einmal entfällt der zeitraubende Vorgang der Selbsterstellung. Zum anderen garantieren Fertigplatten durch die homogene Verteilung des Adsorbens und ihre gleichmässige Schichtdicke unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen ein hohes Mass an Reproduzierbarkeit der Rf-Werte.

Die grössere Abriebfestigkeit der Fertigplatten ermöglicht eine Detektion im Tauchverfahren. Dadurch lässt sich die Nachweisempfindlichkeit erheblich steigern. Ohne dass die Beschichtung darunter leidet, lassen sich Fertigplatten zur Dokumentation aufeinanderstapeln. Ebenfalls ein Vorzug ist die Tatsache, dass im Handel befindliche Fertigplatten durchwegs länger gelagert sind.

Als Trägerplatten wurden DC-Fertigplatten Cellulose F, MERCK Darmstadt, Art.-Nr. 5718, 20 x 20 cm, Schichtdicke ca. 80 μ , und DC-Fertigplatten Kieselgel F-254, MERCK Darmstadt, Art.-Nr. 5715,

20 x 20 cm, Schichtdicke ca. 250 μ , verwendet.

Für die Cellulose-DC dienten CAMAG Sandwichkammern, bestehend je aus Lösungsmitteltrög mit geschlitztem Deckel, Papprahmen und Federklammern. Fixiert wurden die Plattenpakete mit laborüblichen Kühlerklemmen an Stativen.

Die Kieselgel-DC wurde in einer DESAGA Trennkammer (mit Knopfdeckel) durchgeführt. Durch Einsatz einer CAMAG Multi-Sandwichkammer-Garnitur konnten mehrere Platten gleichzeitig entwickelt werden.

Das Auftragen der Proben wurde in allen Fällen mit einem DESAGA Kapillarhalter für Mikrokapillaren à 2 μ l vorgenommen. Die Trocknung der Substanzflecken wurde mit einem handelsüblichen Fön beschleunigt.

Die Laufmittelgemische setzten sich wie folgt zusammen:

Für die Cellulose-DC Ammoniumformiat 0,04 M (pH 4,3): Isopropanol (60/40, v/v), für die Kieselgel-DC n-Propanol: konz. Ammoniak: Wasser (15/20/1, v/v/v). Aufgrund neuerer Untersuchungen von BOHN (3) wurde dieses Laufmittelsystem nicht in der von MARZULLO und LASH vorgeschlagenen Zusammensetzung übernommen.

Der Cellulose-DC wurde die von TELLER beschriebene Anfärbung mit 1 %-iger Alcianblaulösung in Eisessig-Wasser (9/1, v/v) zugrundegelegt. Bei der Kieselgel-DC wurde neben der Färbung mit 1 %-iger Toluidinblaulösung in einem Gemisch aus Äthanol 70 % und Eisessig (95/5, v/v) ausserdem das von BISCHSEL (1) beschriebene Färbereagens, bestehend aus einer 8,8 mg %-igen Lösung von Toluidinblau O in einem Aceton-Methanol-Essigsäure (2 %)-Gemisch (8/36/1, v/v/v) versucht.

Ferner sollte die von WUSTEMANN (33) zitierte Orcinolschwefelsäure (1 %) und das Diazotierungs- bzw. Kupplungsreagens Salpetrigsäure-

Indol eine selektive MPS-Gruppendetektion ermöglichen. Die Färbung im Tauchverfahren wurde in Kunststofftrögen durchgeführt, wie sie beim photographischen Entwicklungsprozess Verwendung finden. UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm lieferte eine CAMAG Universal-UV-Lampe.

Aggressive Sprühreagenzien wurden mit einem DESAGA Reagenzglaszerstäuber vernebelt.

Im Falle der Cellulose-DC erfolgte die Entfärbung stufenweise mit Eisessig, Eisessig-Wasser (1/1, v/v) und Leitungswasser.

Die Kieselgelplatten wurden mit Methanol-Eisessig (9/1, v/v) entfärbt.

In der Arbeitsmethodik wurde die in der DC übliche Verfahrenstechnik eingehalten.

1. Vorbereitung der Platten

Wie es die Sandwichtechnik verlangt, wurde die Sorptionsmittelschicht an drei Seiten der Platten etwa 10 mm breit abgestreift.

In 12 cm Abstand von der Unterkante wurde eine parallele Frontlinie in die Sorptionsmittelschicht geritzt und lockeres Pulver ganz abgeblasen. Bei den Kieselgelplatten wurde lediglich die vorgesehene Laufhöhe von 10 cm markiert.

2. Vorbereitung der Trennkammern

Der Lösungsmitteltrog wurde im Falle der Cellulose-DC unmittelbar vor dem Einsetzen des Sandwichpaketes mit 20 ml Laufmittel beschickt. Nach der Füllung der Trennkammer für die Kieselgel-DC mit 108 ml Fliessmittel wurde das System mindestens 24 Std. bei 4°C gesättigt.

3. Auftragen

2 cm parallel zur Unterkante mit intakter Schicht und 2,5 cm vom seitlichen Rand entfernt, wurden bei der Cellulose-DC die Referenz- bzw. Testlösungen punktförmig aufgetragen.

Zum Auftragen selbst wurden Mikrokapillaren à 2 μ l verwendet, die in einem Mikrokapillarhalter fixiert waren. Der Mikrokapillarhalter wurde mit seiner Kerbe am unteren Plattenrand angesetzt und die Kapillare mit der angesaugten Substanzlösung ohne Beschädigung der Gelschicht auf die Platte aufgesetzt. Die durch Kapillarkwirkung herausgesaugte Flüssigkeit sollte einen Fleck bis zu maximal 3 mm ϕ bilden. Dieser Vorgang wurde nach dem Trocknen des Flecks mehrfach wiederholt, bis die gewünschte Menge Substanzlösung aufgebracht war.

Der Zwischenabstand der Flecke betrug 1,5 cm, so dass bis zu 11 Substanzen Platz finden konnten.

Der Modus des Auftragens erfolgte bei der Kieselgel-DC entsprechend, jedoch wurde hier mit einem seitlichen Abstand von 1,5 mm vom Rand begonnen, so dass eine Substanz mehr aufgetragen werden konnte.

In beiden Fällen wurden Art und Menge der applizierten Lösungen am oberen Plattenrand mit Bleistift vermerkt.

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass für beide Chromatografiearten das günstigste Auftragsvolumen der Lösungen im Bereich weniger Mikroliter lag.

4. Entwicklung

In beiden Fällen wurde aufsteigend entwickelt. Bei der Cellulose-DC unter den Bedingungen der Raumtemperatur, bei der Kieselgel-DC im Kühlschrank bei 4°C.

Je 3 Fertigplatten und 2 auf die freien Ränder plazierte Distanzrahmen bildeten eine Sandwichanordnung, die durch 2 Federklammern an den freien Rändern zusammengehalten wurden.

Für die Kieselgel-DC wurden je 2 luftgetrocknete Platten mit den beschichteten Flächen einander zugekehrt und möglichst senkrecht und rasch in die mit Fließmittel äquilibrierte Trennkammer eingebracht. Zur gleichzeitigen Trennung mehrerer Kieselgelplatten konnten diese mit 2 Haltebügeln verschraubt als Multi-Sandwichanordnung in der Trennkammer chromatografiert werden. Die Fließmittelmenge musste dann entsprechend geändert werden.

Die Entwicklungsdauer betrug 3 - 3 1/2 Stunden für die Kieselgel-DC und ca. 5 Std. für die Cellulose-DC.

In allen Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

5. Detektion

Nach dem Entwicklungsvorgang wurden die getrockneten Platten zunächst unter dem UV-Licht betrachtet und Fluoreszenzlöschungen markiert. Beim anschliessenden Färbeverfahren wurde bei der Cellulose-DC nicht streng das von TELLER (31) vorgeschlagene Zeitschema eingehalten, obwohl die 7-minütige Färbezeit mit Alcianblaulösung genau befolgt wurde. Beim stufenweisen Entfärben mit Eisessig, dann mit Eisessig-Wasser und schliesslich Leitungswasser konnte durch Hin- und Herbewegen der Entfärbemittel der Auswaschvorgang beschleunigt werden. Ausserdem trug eine zweimalige Erneuerung der Entfärbelösung wesentlich dazu bei, dass der ganze Prozess auf 30 Minuten verkürzt werden konnte. Die MPS-haltigen Bereiche auf dem Chromatogramm behielten ihre Farbe auch dann, wenn im Verlauf des Entfärbungsprozesses der Farbstoff des Untergrundes immer mehr durch Auswaschen verschwand.

Schliesslich imponierten alle Flecken als mehr oder weniger scharf

begrenzte Zonen oder Banden von blauer Farbe auf der farbstoff-freien Celluloseschicht.

Bei der Kieselgel-DC hatte es sich nach Vorversuchen als günstig erwiesen, 5 Min. mit Toluidinblaulösung im Tauchverfahren zu färben. Beim Entfärben mit Methanol-Eisessig zweimal je 10 Minuten hoben sich die dunkelblauen Flecken ausreichend deutlich gegen den heller blauen Untergrund ab.

Orcinolschwefelsäure kam als 1 %-ige Lösung in 50 %-iger Schwefelsäure zur Anwendung. Die leicht und gleichmässig besprühte Platte wurde anschliessend im Trockenschrank bei 120°C solange erhitzt, bis eben sichtbare Flecken auftraten (einige Minuten).

Längeres Erhitzen führte dazu, dass alle Flecken gleichmässig dunkel wurden und eine qualitative Unterscheidung der Farbnuancen unmöglich war.

Zum Nachweis der Heparine mit Indolsalpetrigersäure wurde die entsprechende Platte zuerst mit dem frisch bereiteten Gemisch aus 0,5 N-Salpetrigersäure und 2 N-HCl (1/1, v/v) besprüht. Nach 10 Minuten wurde dann Indol in 1 %-iger äthanolischer Lösung mit Zusatz von 10 % Phosphorsäure aufgesprüht.

Im Trockenschrank wurde anschliessend bei 120°C erhitzt, bis Flecken in Erscheinung traten.

6. Dokumentation

Die Dokumentation des Fleckenmusters mit den speziellen Mitteln der DC erübrigte sich, da die detektierten Flecken ihre ursprüngliche Farbe behielten. So konnte das Fleckenmuster der gestapelten Platten auch nach längerer Lagerzeit noch im Original beurteilt werden.

b) Enzymatischer Abbau

Schon seit 1914 ist bekannt, dass Chondroitinsulfat durch Mikroorganismen enzymatisch abgebaut wird (4). In der Folgezeit und besonders in den letzten Jahren wurden von zahlreichen Autoren (z. B. 6, 9, 18, 19, 23, 24, 30) enzymatische Abbauversuche an sMPS beschrieben, mit denen - allein oder in Verbindung mit weiteren Analysemethoden - eine Charakterisierung der untersuchten Polyanionen möglich war. Heute existieren spezifische Chondroitinasen relativ hohen Reinheitsgrades (34), die eine selektive Spaltung von Chondroitinsulfaten in niedermolekulare Saccharide gestatten.

DIETRICH et al. (7) veröffentlichten 1972 eine erfolgreiche elektrophoretische Charakterisierung eines MPS-Gemisches nach enzymatischer Hydrolyse mit Chondroitinase AC und Chondroitinase ABC. In Anlehnung an dieses Verfahren wurde der Versuch unternommen, diese Ergebnisse für die DC nutzbar zu machen. Dabei wurde von der Tatsache ausgegangen, dass die nach dem enzymatischen Abbau entstandenen Produkte der MPS bei dem verwendeten Färbeverfahren den spezifischen Nachweis mit dem basischen Phthalocyaninfarbstoff Alcianblau nicht mehr gestatten (5). Chromatografiert man nun die zu untersuchenden MPS bzw. Gemische jeweils vor und nach ihrem enzymatischen Abbau, so müsste sich bei der Detektion ein differentes Fleckenmuster ergeben. Eine spezifische Identifizierung nach Art einer Ausschlussdiagnose wäre damit möglich.

In einem Vorversuch wurden zunächst 3 MPS-Gemische (CSA + DS + CSC, CSA + CSC + HS, DS + HS) enzymatisch behandelt und gegen ihre Nativformen chromatografiert, um einen Hinweis über Aktivität und Konzentrationsbereich der Enzyme zu gewinnen.

In gleicher Weise wurden dann 6 Urin-Eluate auf ihr dc Verteilungsverhalten geprüft.

Für die DC wurde das Celluloseschichtverfahren gewählt, da, wie im

folgenden ausgeführt wird, mit dieser Methode eine Auftrennung der Urin-MPS über einen grösseren Rf-Bereich möglich war. Die Durchführung der DC richtete sich nach den bereits beschriebenen Gesichtspunkten.

Die zum enzymatischen Abbau benutzten Enzyme und deren Eigenschaften sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

TABELLE III

Übersicht über die verwendeten Mucopolysaccharidasen

Enzym	Kurzbez.	Herkunft	Reinheit	Aktivität	Bemerkung
Chondroitinase AC	AC	Flavobact. heparinum	Glucuronidase weniger als 5×10^{-3} I.E.	5 I.E./Amp.	SEIKAGAKU Tokio
Chondroitinase ABC	ABC	Proteus vulg.	4-Sulfatase weniger als $2,5 \times 10^{-5}$ I.E. 6-Sulfatase weniger als $2,5 \times 10^{-5}$ I.E.	5 I.E./Amp.	SEIKAGAKU Tokio

Die Enzympräparationen wurden folgendermassen hergestellt:

100 μ g jedes Mucopolysaccharids (bei Gemischen je 100 μ g Gesamt-MPS, bei den Urin-Eluaten je 1 ml mit 100 μ g MPS) wurden 4 Std. lang bei 37°C inkubiert je mit

- 0,1 I.E. Ch-ase AC, gelöst in 0,05 M Ammoniumazetatpuffer pH 7
- 0,1 I.E. Ch-ase ABC, gelöst in 0,05 M Tris-HCl - Puffer pH 8

3. ERGEBNISSE

Aus der Vielzahl der dc Untersuchungen seien zwei Chromatogramme wiedergegeben, die das für die chromatografierten Substanzen charakteristische Fleckenverteilungsmuster schematisch aufzeigen. Von der Abbildung weiterer Chromatogramme wurde Abstand genommen, da sich in allen untersuchten Fällen ein analoges Verteilungsverhalten mit kaum nennenswerten Rf-Wert-Differenzen reproduzieren liess.

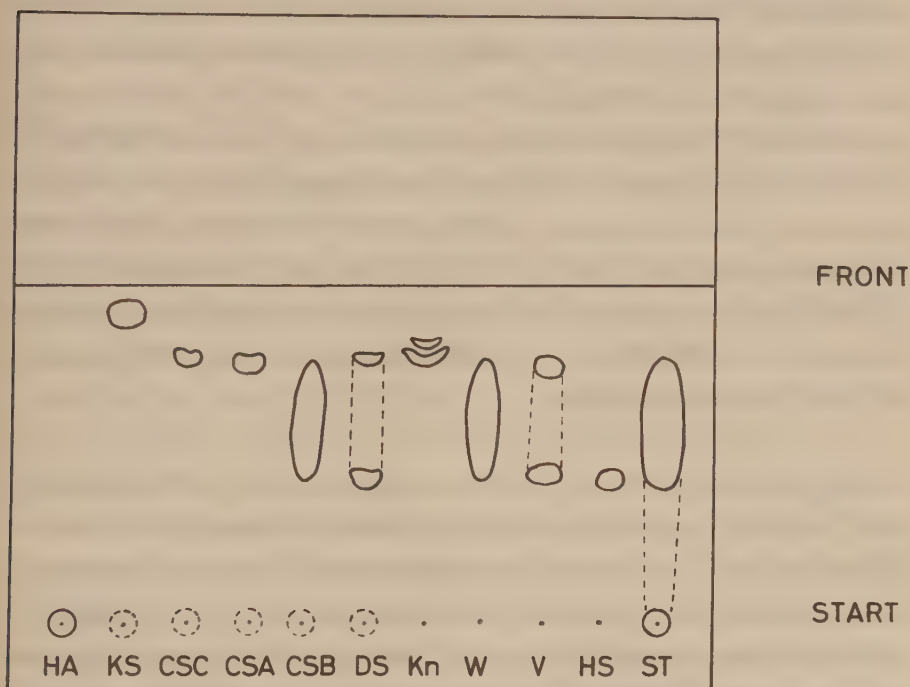


ABBILDUNG 1

DC der sMPS auf Kieselgel F 254 Fertigplatten

Laufm.: n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (15/20/1, v/v/v)

Wie aus Abbildung 1 zu ersehen ist, liessen sich HA, KS und HS mit deutlichen Rf-Unterschieden trennen.

Die Hyaluronsäure verblieb am Start. Als uronsäurefreies relativ apolares Molekül zeigte Keratansulfat die grösste Wanderungsstrecke. Mit einem Rf-Wert von ca. 0,5 lag Heparansulfat zwischen beiden. Ohne deutlichen Rf-Unterschied lagen die stereochemisch ähnlichen Chondroitinsulfate A, B, C in einer Front und konnten einzeln nicht unterschieden werden.

Auffällig war, dass die beiden Dermatansulfate verschiedener Provenienz (CSB und DS) in Höhe von HS einen weiteren Fleck aufwiesen, der als Kontamination mit HS gedeutet wurde.

Ebenso wie der Elektrophoresestandard zeichnete sich das MPS-Gemisch der Urinextrakte V und W als bandförmige Zone im oberen Rf-Bereich ab. Einzelne Flecken hoben sich nicht deutlich ab. Eine exakte Zuordnung von Test- und Referenzsubstanz war nicht möglich.

Der Knorpelextrakt lieferte zwei scharfbegrenzte sichelförmige Flecken mit dem Rf-Wert der Chondroitinsulfate. Eine nähere Differenzierung war jedoch nicht möglich.

Je nach dem pK-Wert ihrer sauren Gruppen lagen alle MPS in diesem stark basischen Laufmittelsystem Ammoniak/n-Propanol mehr oder weniger ionisiert vor. Da jedoch physikochemische und physikalische Wechselwirkungen die Verteilungscharakteristik auf einem Chromatogramm in hohem Masse beeinflussen, liess sich eine Aussage über die Wanderungstendenz dieser strukturell nur wenig unterschiedlichen Glycosaminoglykane schwerlich treffen.

Obwohl das von BOHN (3), der 120 Fließmittelsysteme zur Auftrennung von MPS-Gemischen überprüfte, als besonders vorteilhaft angegebene Laufmittel für diese Untersuchung ausgewählt wurde, gelang es

nicht die von MARZULLO und LASH erhaltenen deutlichen Rf-Unterschiede zu reproduzieren.

Weiterhin gelang es nicht, die Urin-MPS so aufzutrennen, dass eine Identifizierung mit den Vergleichssubstanzen hätte vorgenommen werden können.

Die letzteren beiden Autoren fanden ausserdem, dass der Rf-Wert für CSB kleiner war als für HS. Dies konnte im Verlauf dieser Untersuchung in keinem Fall bestätigt werden. Die von SPOLTER und MARX (25) angegebene stärkere Polarität von Heparinen dürfte in diesem Laufmittelsystem auch für HS Gültigkeit besitzen. Danach besitzt HS einen kleineren Rf-Wert als CSB, was in allen Fällen zutraf.

WUSTEMANN et al. (33) haben für Polysaccharide spezifische Farbreaktionen beschrieben und ein Screening-Schema zur Identifizierung eines MPS-Gemisches vorgeschlagen.

Trotz peinlicher Einhaltung dieser Arbeitsanleitung konnten diese Ergebnisse, nämlich die Chondroitinsulfate, Heparine und Keratansulfat mit den beiden o. a. Reagenzien selektiv zu detektieren, nicht nachvollzogen werden. Abgesehen davon, dass im vorliegenden Fall alle Flecken die gleiche graubraune Tönung aufwiesen, lassen ohnehin die zitierten Mischfarben purpurgrau und gelbbraun lediglich eine subjektive Auswertung zu. Ausserdem besteht in der Tatsache, dass die Platten nach dem Besprühen "solange erhitzt werden sollen, bis die charakteristischen Farben erscheinen" eine zusätzliche Fehlerquelle.

Auf eine farbfotografische Wiedergabe der Farbnuancen wurde deshalb verzichtet. Auch durch eine derartige, im Rahmen dieser Arbeit weniger adäquaten Reproduktionstechnik, könnte kaum eher der Eindruck vermittelt werden, ein Gemisch von der Heterogenität der MPS, liesse sich mit Farbreagenzien allein gruppenspezifisch separieren.

Die von BISCHSEL et al. (1) modifizierte Toluidinblaufärbung liess alle

Flecken mit Ausnahme der Hyaluronsäure blassrot erscheinen. Eine spezifische Charakterisierung der vorliegenden HA war damit möglich, wenngleich sie in diesem Zusammenhang von untergeordnetem Interesse war. Gegenüber der Färbung mit 1 %-iger Toluidinblaulösung zeigte die Detektion mit diesem Farbreagens keine Vorteile, da sich durch die unscharfe Randstruktur und die leichter verblassende Farbintensität eine spätere Identifizierung der Flecken schwieriger gestaltete.

Die Fluoreszenzlöschungen beim Betrachten der Platten unter dem UV-Licht leisteten zur weiteren Charakterisierung der Flecken keinen Beitrag. Dieser Befund überraschte nicht, da die typischen Absorptionsbanden der MPS im Infrarot liegen. Sowohl im kurzwelligen wie auch im langwelligen UV-Licht hoben sich zwar in Laufrichtung der Substanzen mässig scharf begrenzte Flecken durch eine dunklere Färbung gegen die bläuliche Fluoreszenz der Sorptionsschicht ab, beim anschließenden Detektieren mit Farbreagens zeigte sich jedoch, dass es sich dabei nicht immer um farbstoffaffine MPS handelte. Im gleichen Masse sind deshalb zur DC der MPS Sorbentien ohne Fluoreszenzindikator geeignet.

Im Gegensatz zur Chromatografie der MPS auf Kieselgelplatten wurden bei der Verwendung der Celluloseschichtchromatografie hinsichtlich der Analyse der Urin-MPS etwas bessere Ergebnisse erzielt.

Die Flecken auf dem in Abbildung 2 gezeigten Chromatogramm waren durch unterschiedliche, aber deutliche Schwanzbildung gekennzeichnet und dadurch etwas weniger scharf ausgeprägt.

Diese Beobachtung entspricht der Vermutung, dass es bei der Verwendung von sauren Laufmitteln während der DC von Polysacchariden zu Wechselwirkungen zwischen Fliessmittel und Adsorbendum kommen kann (Veresterung, Anomerenbildung etc.) (11).

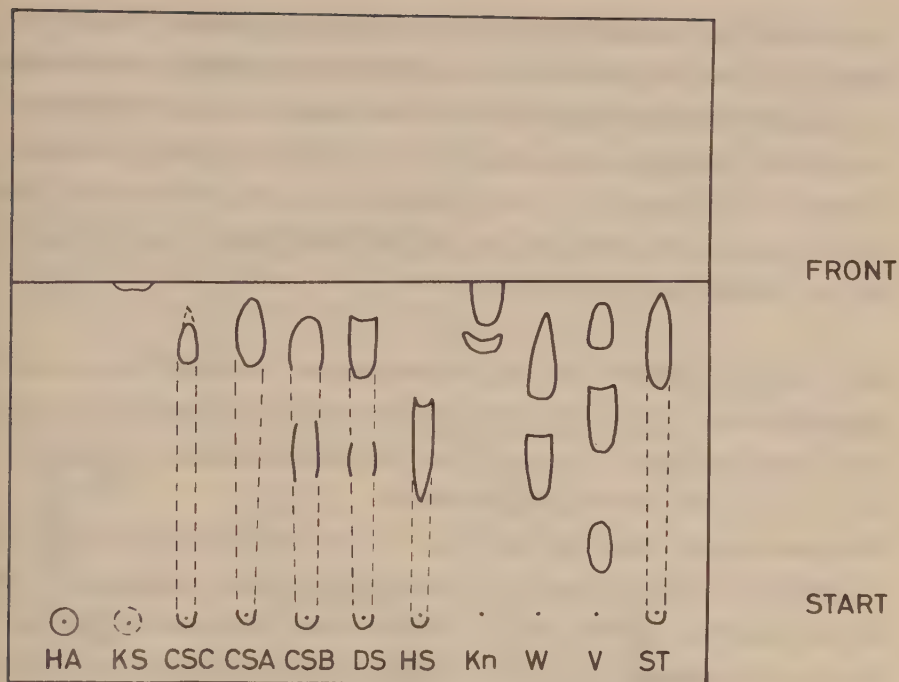


ABBILDUNG 2

DC der sMPS auf Cellulose F Fertigplatten

Laufm.: Ammoniumformiat pH 4,3 / Isopropanol (60/40, v/v)

Auch hier wurde das HA-Kaliumsalz erwartungsgemäss vom schwach sauren Lösungsmittel nicht mitgenommen. HS konnte im mittleren Rf-Bereich identifiziert werden. Alle übrigen Vergleichssubstanzen waren infolge ihrer geringen Rf-Unterschiede nicht zu trennen.

Bemerkenswert war, dass alle chromatografierten Substanzen im oberen Rf-Bereich mehr oder weniger ausgeprägte Flecken zeigten.

Für das Verteilungsverhalten des HS und der Chondroitinsulfate ist in diesem sauren Laufmittelsystem der Gehalt an Sulfatgruppen der ein-

zelenen MPS massgebend (25). Der relativ niedrige Puffer-pH von 4,3 führt dazu, dass die Dissoziation zuerst an der schwächer sauren Carboxylgruppe zurückgedrängt wird. Obwohl damit die negative Nettoladung dieser Moleküle abnimmt, steigt der relative Beitrag der Sulfatgruppe an der Ladung an. Sulfatgruppenreichere Moleküle wie HS sind somit polarer und besitzen einen geringeren Rf-Wert als die vergleichbaren Chondroitinsulfate (25).

Wenn mit der Cellulose-DC die Auftrennung der Urin-MPS auch etwas besser gelang, so war eine eindeutige Identifizierung jedoch nicht möglich. Eine Korrelation von Test- und Vergleichssubstanz bewegte sich auch hier nur im Bereich der Spekulation.

Geht man von der Annahme aus, dass es sich bei den von TELLER und ZIEMANN (31) angegebenen Rf-Werten aufgrund ihrer Inkongruenz mit der gleichzeitig veröffentlichten Abbildung um Vertauschung des Zahlenmaterials handelt, so wurden für die Chondroitinsulfate und für Heparansulfat aus den Urin-MPS-Gemischen ähnlich reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Nach den bisherigen Ergebnissen lässt sich aussagen, dass eine qualitative Bestimmung von sMPS aus dem Urin, wie sie für analytische Zwecke wünschenswert wäre, mit diesen beiden DC-Methoden nicht zu erreichen war.

Zwar war es möglich, an Hand von gereinigten Referenzsubstanzen mit der Kieselgel-DC das eine oder andere MPS zu identifizieren, die Analyse einer Mischung aber, wie sie im Urin Mucopolysaccharidose-kranker angetroffen wird, liess sich nicht durchführen.

Umgekehrt konnte mit der Cellulose-DC zwar ein Urin-MPS-Gemisch getrennt werden, die Trennleistung für chemisch definierte MPS war jedoch ungenügend.

Die folgenden Abbildungen ~~geben einen~~ schematischen Überblick über die dc Trennergebnisse der MPS vor (nativ) und nach ihrer enzymatischen Degradation mittels spezifischer Mucopolysaccharidasen.

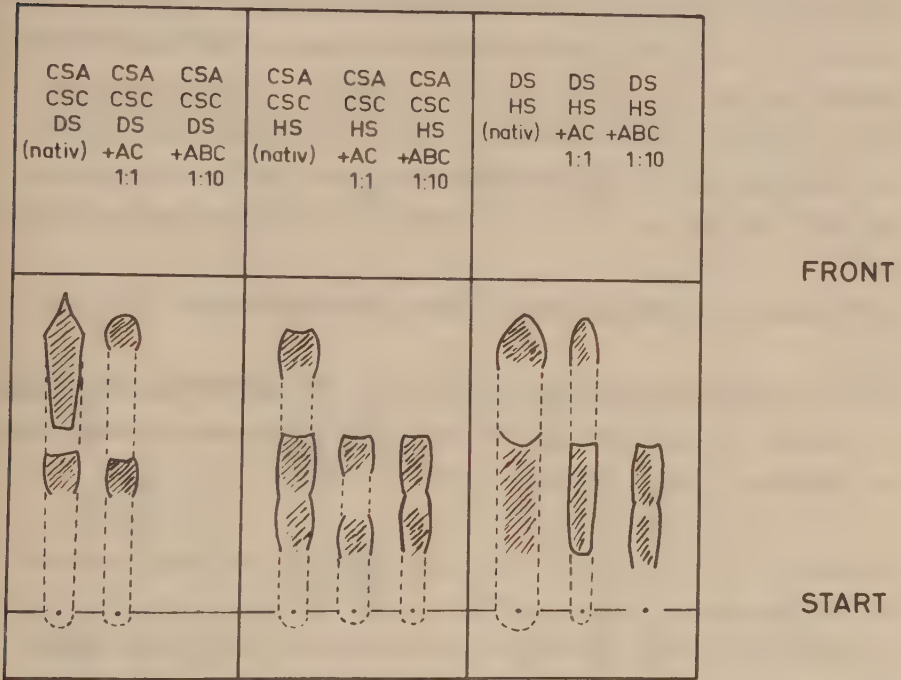


ABBILDUNG 3

DC dreier sMPS-Gemische auf Cellulose F Fertigplatten vor und nach enzymatischem Abbau

Im Vorversuch (s. Abb. 3) wurde festgestellt, dass die Enzyme AC und ABC unterschiedliche Aktivität besaßen.

Während das Substratgemisch aus CSA, CSC und DS von Enzym AC bereits im Verhältnis MPS : Enzym = 1 : 1 (v/v) abgebaut wurde, war dies im Falle der Spaltung durch Enzym ABC dünnstschichtchromatografisch (dc) erst nachweisbar, wenn eine Inkubation mit 10-fach

höherer Konzentration an Enzym ABC vorausgegangen war.

Aus Abbildung 3 geht hervor, dass sich der dem DS entsprechende MPS-Anteil des Gemisches AC gegenüber als resistent verhielt. Eine enzymatische Degradation durch Enzym AC war auch dann nicht nachweisbar, wenn die Enzymkonzentration 100-fach erhöht wurde.

DS war hier durch 2 deutlich begrenzte Flecken charakterisiert. In einer weiteren Konzentrationsreihe wurde durch Behandlung von DS und CSC, jeweils mit verschiedenen Konzentrationen der Enzyme AC und ABC, der auf ca. 1 : 10 geschätzte Aktivitätsunterschied bestätigt.

MPS-Gehalt und Auftragemenge blieben dabei konstant.

Gegenüber dem zweiten Gemisch aus CSA, CSC und HS verhielten sich die Enzyme AC und ABC so, dass mit den beschriebenen Konzentrationen lediglich HS nicht abgebaut wurde.

Weiterhin zeigt Abbildung 3 die Chromatografie des Gemisches HS und DS. Im oberen Rf-Bereich fällt der für DS typische Fleck auf, der gegenüber dem Abbau mit Enzym AC stabil blieb, nach Spaltung mit Enzym ABC aber nicht mehr färbereich aufgedeckt werden konnte. Die breite, langgestreckte Zone im unteren Rf-Bereich ist charakteristisch für HS. Ihre Farbe imponierte durch Überlappung mit dem unteren DS-Fleck stärker. Dass dieser Fleck nach Abbau mit Enzym AC deutlich farbschwächer war, kann durch eine teilweise Spaltung von HS mit Enzym AC gedeutet werden (9). DS wurde durch Enzym ABC soweit zerlegt, dass sich die Spaltprodukte nicht mehr mit Alcianblau anfärben liessen. Aus der Tatsache, dass von dem unteren Überlappungsfleck nur der für HS typische resistent war, wurde der vollständige Abbau von DS durch Enzym ABC geschlossen.

Fasst man die Ergebnisse dieser Voruntersuchung zusammen, so bestätigt sich, dass beide Enzyme im jeweiligen Konzentrationsbereich die untersuchten MPS-Gemische in ihre Mono- bzw. Oligomeren zerlegen. Die nicht enzymatisch gespaltenen, resistenten MPS können detektiert werden.

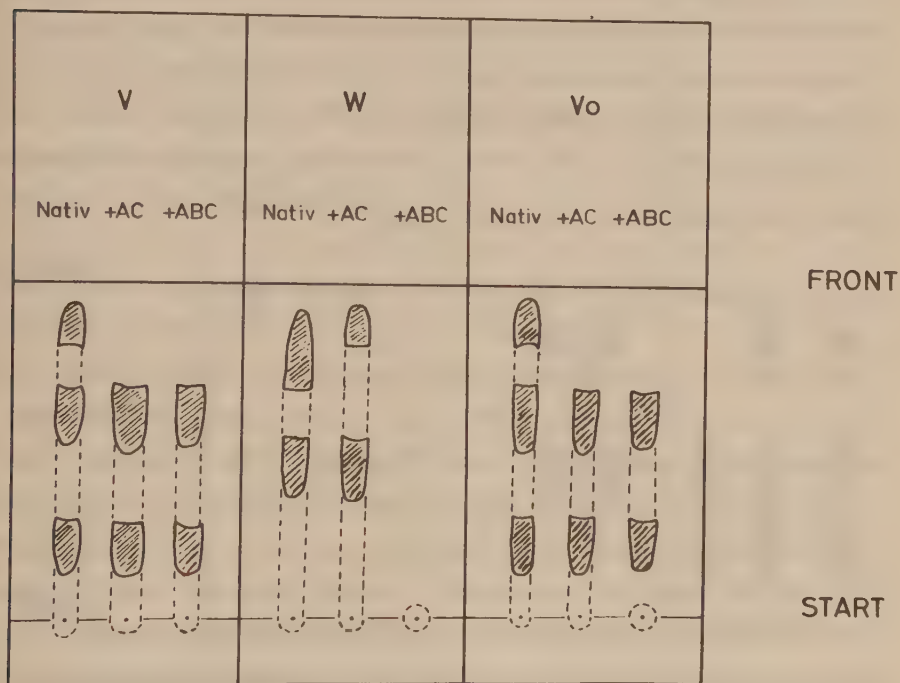


ABBILDUNG 4

DC der Urin-MPS auf Cellulose F Fertigplatten

Aus den Abbildungen 4 und 5 ist ersichtlich, dass jeweils zwei Chromatogramme ein annähernd identisches Fleckenmuster aufweisen. Die Chromatogramme V und Vo geben bei der DC ohne vorherigen enzymatischen Abbau (nativ) 3 Flecken wieder. Bei Chromatografie der Unter-

suchungslösung nach Inkubation mit Enzym AC ist der Fleck mit dem grössten Rf-Wert nicht mehr nachzuweisen. Die Rf-Werte der beiden übrigen Enzym-ABC-resistenten Flecken lassen auf HS schliessen, zumal da in allen Fällen bei der Urin-MPS-DC für HS zwei unmittelbar übereinanderliegende Flecken gefunden wurden.

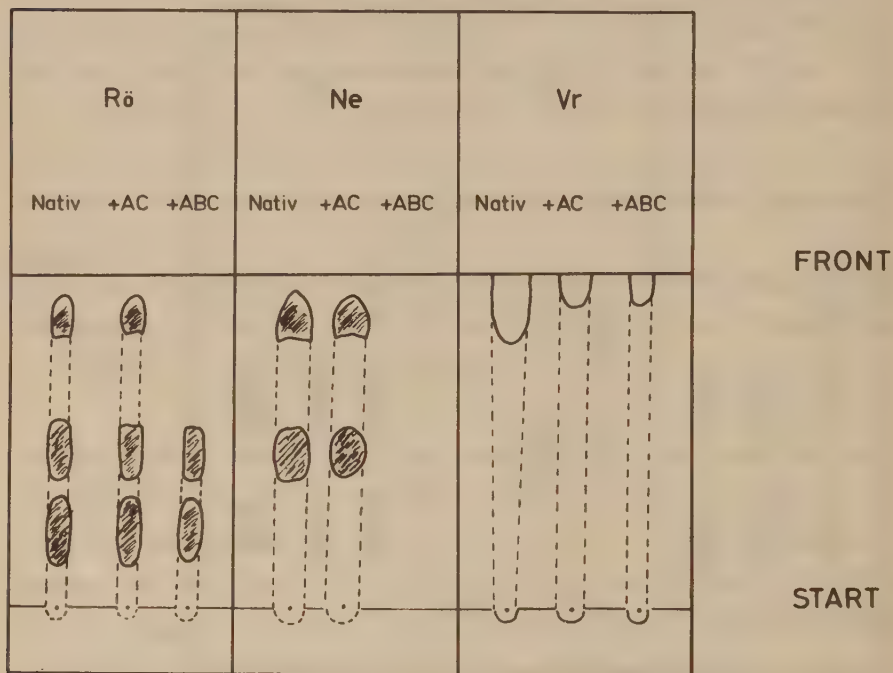


ABBILDUNG 5

DC der Urin-MPS auf Cellulose F Fertigplatten

Ein identisches Fleckenverteilungsmuster sieht man auch auf den Chromatogrammen W und Ne. Die Resistenz beider Flecken gegenüber Enzym AC und ihr Verschwinden nach Applikation des Enzyms ABC weisen auf DS hin. In einem Fall war der Mucopolysaccharidosetyp I kli-

nisch sicher bestätigt. Aus dem Urin-DC dürfte sich somit ein wesentlicher Hinweis für die klinische Diagnostik des entsprechenden zweiten MPS-Urinausscheidungsmusters ergeben.

Das Chromatogramm R₀ entspricht den in der Voruntersuchung getroffenen Feststellungen über das Gemisch aus HS und DS und dessen dc Verhalten gegenüber den Enzymen AC und ABC.

Alle Flecken im unteren R_f-Bereich weisen die gleiche Grösse auf. Ein zweiter Fleck, wie er für das DS des Handels in den vorangegangenen Untersuchungen typisch war, dürfte hier aller Wahrscheinlichkeit nach auszuschliessen sein.

Über das dc Verhalten des Keratansulfates auf Celluloseplatten wurde bereits berichtet.

Im Chromatogramm V_r konnten erwartungsgemäss drei Flecken im Laufmittelfrontbereich detektiert werden. Während sich der "Nativfleck" von der Front bis in den R_f-Bereich der Chondroitinsulfate erstreckte, verblieben die beiden anderen, für KS typischen Flecken dicht an der Laufmittelfront, auch nach 100-fachem Enzymüberschuss unbeeinflusst. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, findet sich bei der Mucopolysaccharidose IV im Urin neben KS auch Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat. Während letztere von den Enzymen abgebaut wurden, wies das resistente KS eindeutig auf die klinisch bestätigte Diagnose "morbus MORQUIO" hin.

In Anbetracht des seltenen Vorkommens dieser Mucopolysaccharidose sei im Anschluss an diese Ergebnisse auf die Kasuistik der vorliegenden MORQUIOSchen Erkrankung näher eingegangen.

Bei dem am 3.5.1969 geborenen Knaben wurde bereits im Alter von 13 Monaten eine deutliche Wirbelsäulenverkrümmung beobachtet, die

im weiteren Verlauf als rachitische Kyphoskoliose durch eine Gipsliegende behandelt wurde. Eingehende röntgenologische Skelettuntersuchungen im Rahmen eines spezifischen Lungenprozesses im April 1972 ergaben Thoraxveränderungen in Form einer linkskonvexen Kyphoskoliose der unteren Brustwirbelsäule und oberen Lendenwirbelsäule mit deutlicher Vorbuckelung der Brustwirbelsäule.

Weitere Befunde wie auffallende Wirbelkörperform (Fischwirbel), Dysplasie der Hüftgelenke, Coxa valga-Stellung der Beine, plumpe Veränderungen am Handskelett vor allem der Metacarpalia sowie Hypertelorismus, Dysmorphie des Schädels und Ossifikationsstörungen im Bereich der Kniegelenke legten bereits damals den Verdacht nahe, es könnte sich um eine Mucopolysaccharidose handeln.

Die Prüfung des Hörvermögens lieferte ebenso wie die ophthalmologische Untersuchung jedoch keinen Anhaltspunkt für diese Vermutung: Bei der Spaltlampenuntersuchung ohne Narkose war die Hornhaut klar und wies keine Einlagerungen auf.

Die Untersuchung des Sammelurins ergab 2185 I.E. Gesamt MPS entsprechend ca. 17 mg sMPS. Legt man für die Normalausscheidung bei Kindern nach TELLER (32) $13,55 \pm 7,0$ mg/24 Std. zugrunde, so lag der MPS-Gehalt über der Norm bzw. an der oberen Grenze. Auch wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass für dieses untersuchte Kind ausländischer Gastarbeiterseheleute die sprachliche Kommunikationsmöglichkeit von vornherein eingeschränkt gewesen sein dürfte, so lässt sich aus den anamnestischen Angaben doch entnehmen, dass Hinweise auf eine geistige Retardierung auszuschliessen sind.

4. DISKUSSION

Die Fülle des bisher publizierten Materials zur qualitativen und quantitativen Erfassung saurer Mucopolysaccharide weist bereits auf die Schwierigkeiten hin, welche die Analytik dieser Substanzgruppe bereitet. Bis heute sind geeignete Verfahren zur einfachen und exakten Bestimmung aller Polyanionen eigentlich nicht bekannt geworden. Auch die Ergebnisse dieser kritischen Überprüfung zweier der Bestimmungsverfahren verwischen den Eindruck nicht, dass auch für bestimmte Bereiche der Mucopolysaccharidanalytik geeignete erscheinende Methoden nicht immer reproduzierbare und den Literaturangaben entsprechende Resultate ergeben. Somit erhebt sich die Frage, worauf diese Abweichungen beruhen könnten.

Zunächst dürfte dies an der zum Teil recht unterschiedlichen Zusammensetzung und Beschaffenheit der hier und von anderen Autoren benutzten Vergleichssubstanzen liegen.

Präparative Methoden zur Darstellung bzw. Gewinnung einzelner MPS sind bis heute nicht standardisiert. Ursprung, Herstellungsart und Bezugsquelle der im Handel erhältlichen MPS sind jedoch von entscheidender Bedeutung hinsichtlich ihrer Verwendung als Referenzsubstanzen. Faktoren wie Molekulargewicht, Sulfatierungsgrad, Ionenstärke und Protein- bzw. Peptidanteil bestimmen weitgehend die Eigenschaften dieser Substanzen und können entsprechend der unterschiedlichen biologischen Herkunft, Isolierung und Aufbereitung variieren.

Ferner ist bekannt, dass die in natürlichem Gewebe vorkommenden MPS häufig Hybride darstellen (10). Dabei kann ein bestimmter charakteristischer MPS-Baustein in ein anderes eingebaut werden.

Da die genannten Kriterien bei der Analytik der MPS von grösster Bedeutung sind, dürften die Abweichungen der Ergebnisse von denen an-

derer Autoren in erster Linie auf diese Heterogenität des Untersuchungsmaterials zurückzuführen sein. Somit erscheint es nicht gerechtfertigt, die beiden in der Literatur beschriebenen Verfahren, die sich für diese Untersuchungen nicht in erwartetem Mass bewährten, als unbrauchbar zu beurteilen.

Neben der Heterogenität des Untersuchungsmaterials können auch geringe Abweichungen in der Methode als Ursache für die Divergenzen in Frage kommen. Äussere Einflüsse, insbesondere Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Lauf- und Lagerzeit der Platten sowie Sättigungsgrad der Trennkammern beeinflussen die Trennergebnisse massgeblich. Obwohl die entsprechenden Angaben der genannten Autoren streng eingehalten wurden, lagen geringfügige Differenzen durchaus im Bereich des möglichen.

Die biochemische Abnormalität der vermehrten Ausscheidung von HS im Urin wurde erstmals an zwei als HURLER-Syndrom diagnostizierten Fällen beobachtet (15). SANFILIPPO et al. haben später diese polydystrophia oligophrenia als Mucopolysaccharidose H. S. bestätigt.

Vielfach wird für den Typ I zusätzlich eine HS-Exkretion im Urin gefordert.

MATALON et al. (17) fanden bei Fruchtwasserpunktionen an 40 Schwangeren in einem Fall, der sich postnatal als HURLER-Syndrom erwies, einen Gehalt von ca. 63 % HS, das auch im Urin als Hauptkomponente bestätigt wurde. Eine weitere Beschreibung der klinischen Symptomatik fehlt jedoch.

Nach Untersuchungen von MAROTEAUX (15) kann der HS-Gehalt im Urin bei Typ I zwischen 5 % und 40 % schwanken.

SPRANGER et al. (27) stellten bei gesunden Säuglingen starke Ausscheidung von HS fest, die im Verlauf des Wachstums abnahm. Ausserdem wurde darauf hingewiesen, dass es im Erwachsenenalter neben Personen mit relativ hoher Ausscheidung von Chondroitinsulfaten solche mit

starker HS-Ausscheidung gäbe.

Diese wenigen Beispiele mögen auf die Problematik aufmerksam machen, inwieweit der Gehalt an Heparansulfat im Urin Mucopolysaccharidosekranker des Typs I zur Charakterisierung des morbus PFAUNDLER-HURLER herangezogen werden kann.

Die gonosomal vererbte Mucopolysaccharidose des Typus II wird heute nach HUNTER benannt. Eine relativ hohe HS-Ausscheidung im Urin, KOCH (12) gibt beispielsweise 45 % an, und das Fehlen der für Typ I spezifischen Symptome wie Hornhauttrübung und charakteristischer Lymphozytenveränderung, lassen es fraglich erscheinen, bei diesem Krankheitsbild von einer HURLER-Varietät zu sprechen.

Die von SPRANGER et al. (26) beschriebenen röntgenologischen und biochemischen Befunde trafen im wesentlichen auch für den hier untersuchten Mucopolysaccharidostyp IV zu. Eine Hornhauttrübung jedoch, wie sie von diesen Autoren als obligat für die MORQUIOSche Erkrankung postuliert wird, konnte nicht festgestellt werden.

Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den von DORFMAN (8) gemachten Angaben, wonach für die Mucopolysaccharidose IV das Auftreten von Hornhauttrübungen möglich sein kann.

Es ist deshalb zu überlegen, ob eine in allen Fällen eines morbus MORQUIO geforderte Hornhauttrübung einer erneuten Diskussion bedarf.

Nach WIEDEMANN wird die seltene Dysostosis MORQUIO viel zu häufig diagnostiziert. Da jedoch die Keratansulfaturie nur für diesen scharf umrissenen Typus zutrifft (26), kommt der DC neben weiteren laboratoriumsdiagnostischen Möglichkeiten bei der Differentialdiagnose der Mucopolysaccharidosen gerade hier eine wichtige Funktion zu. Die pathologische Mehrausscheidung von Keratansulfat geht mit zunehmen-

dem Alter zurück und kann bei Erwachsenen sogar normal sein. Die Grenzen der klinisch chemischen Untersuchungsmöglichkeit sind damit aufgezeigt. Ein MORQUIO des späteren Lebensalters kann nur nach der speziellen klinischen und röntgenologischen Morphologie allein sicher bestätigt werden.

Abschliessend zu den hier unternommenen Untersuchungen kann festgestellt werden, dass mit der DC unter Zuhilfenahme enzymatischer Abbaumethoden eine biochemische Differenzierung der Urin-MPS möglich ist. Die dc Detektion kann jedoch nur anhand eines Vergleichs-urines bekannten Mucopolysaccharidosetyps vorgenommen werden. Eine endgültige Diagnose des jeweiligen Krankheitstyps muss letztlich der Synopse aller klinischen Parameter vorbehalten bleiben.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Untersuchung war es, die Spezifität zweier der Methoden zu beurteilen und ihre mögliche Anwendbarkeit zu näheren Charakterisierung von MPS im Urin mucopolysaccharidosekranker Kinder zu überprüfen. Dabei galt es vor allem ein Verfahren aufzufinden, das eine genaue Differenzierung gestattete.

In der Brauchbarkeit der beiden Verfahren bestanden zum Teil recht erhebliche Unterschiede: Während die Kieselgel-DC zur Analyse einzelner MPS durchaus geeignet war, versagte sie bei der Auftrennung eines MPS-Gemisches unter den geprüften Bedingungen. Die Anwendung der Cellulose-DC dagegen konnte für die Differenzierung eines MPS-Gemisches aus dem Urin durchaus positiv bewertet werden. Eine exakte Analyse der einzelnen MPS gelang auch damit nicht. Aufgrund dieser Tatsache wurde versucht, die DC mit enzymatischer Spaltung zu kombinieren. Durch Chromatografie vor und nach dem enzymatischen Abbau war es möglich, nach Art eines Ausschlussverfahrens einzelne MPS näher zu bestimmen. Die Feststellung des MPS-Ausscheidungsmusters im Mucopolysaccharidose-Urin konnte jedoch nur mit einem Vergleichsurin bekannten Typs vorgenommen werden. Diese qualitative Analyse in Form der enzymatischen Dünnschichtchromatografie könnte einen möglichen Anhaltspunkt für die weitere klinisch diagnostische Abklärung der Mucopolysaccharidosen darstellen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. BISCHEL, M.D., AUSTIN, J.H., KEMENY, M.D., HUBBLE, C.M.
and LEAR, R.K.
Separation and identification of acid polysaccharides by thin-layer chromatography.
J. Chromatog. 21 (1966), 40-45
2. BOBBIT, J.M. Thin Layer Chromatography
Reinhold Publishing Company, New York and
Chapman and Hall, London, 1963
3. BOHN, R. Vergleichende Untersuchungen über analytische
Verfahren zur Auftrennung saurer Mucopolysaccharide.
Dissertation, Math.-Nat.Fak., Bonn (1970)
4. BRIMACOMBE, J.S. and WEBBER, J.M.
Mucopolysaccharides
Elsevier, Amsterdam/London/New York 1964
5. BURCK, H.C. Histologische Technik, 2. Aufl.
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1969
6. CIFONELLI, J.A.
Chemistry of β -heparin (chondroitin-sulfuric acid-B)
J. biol. Chem. 233 (1958), 541
7. DIETRICH, C.P. and DIETRICH, S.M.C.
Simple micro method for identification of heparin
and other acidic mucopolysaccharides from mammalian tissues.
Analyt. Biochem. 46 (1972), 209-215
8. DORFMAN, A. Die molekulare Grundlage der Mucopolysaccharidosen:
der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse.
Triangel, Bd.11 Nr.2 (1972), 43-50
9. GOLDBERG, J.M. and COTLER, E.
Specific isolation and analysis of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) from human urine.
Clin. Chim. Acta 41 (1972), 19-27

10. GREILING, H. Bestimmungsmethoden von Mucopolysacchariden und Glycoproteiden. D-Glucose
F.Enke Verlag, Stuttgart 1970
11. JEANES, A., WISE, C. S. and DIMLER, R. J.
Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates.
Anal. Chem. 23 (1951), 415
12. KOCH, F. und de SOUSA, F.
Zur Frühdiagnose der Mucopolysaccharidosen.
Med. Welt 9 (1970), 362-364
13. LIPPIELLO, L. and MANKIN, H. J.
Thin-layer chromatographic separation of the isomeric chondroitin sulfates, dermatan sulfate and keratan sulfate.
Analyt. Biochem. 39 (1971), 54-58
14. MARINI-BETTOLO, G. B.
Thin Layer Chromatography
Elsevier, Amsterdam/London/New York 1964
15. MAROTEAUX, P. and LAMY, M.
Hurler's disease, Morquio's disease and related mucopolysaccharidoses.
J. Pediat. 67 (1965), 312-323
16. MARZULLO, G. and LASH, J. W.
• Separation of glycosaminoglycans on thin layers of silica gel.
Analyt. Biochem. 183 (1967) 575-578
17. MATALON, R., DORFMAN, A., NADLER, H. L. and JACOBSON, C. B.
A chemical method for the antenatal diagnosis of mucopolysaccharidoses.
Lancet (1970/I), 83-84
18. MATHEWS, M. B. and INOUE, M.
The determination of chondroitin sulfate C-type polysaccharides in mixtures with other acid mucopolysaccharides.
Biochim. Biophys. Acta 53 (1961), 509

19. MEYER, K., DAVIDSON, E., LINKER, A. and HOFFMAN, P.
The acid mucopolysaccharides of connective tissue.
Biochim. Biophys. Acta 21 (1956), 506
20. MEYER, K. and HOFFMAN, P.
Hurler's syndrome.
Arthritis Rheum. 4 (1961), 552
21. RANDERATH, K.
Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1965
22. RAUEN, H. M. Biochemisches Taschenbuch, 2. Bd.
Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York,
1964
23. SAITO, H., YAMAGATA, T. and SUZUKI, S.
Enzymatic methods for the determination of small
quantities of isomeric chondroitin sulfates.
J. biol. Chem. 243 (1968), 1536-1542
24. SCHMIDT, M. and DMOCHOWSKI, A.
The determination of small quantities of isomeric
chondroitin sulfates
Biochim. Biophys. Acta 83 (1964), 137
25. SPOLTER, L. and MARX, W.
Paper chromatography of heparin and related sul-
fated mucopolysaccharides.
Biochim. Biophys. Acta 38 (1960), 123-129
26. SPRANGER, J. und SCHUSTER, W.
Diagnose und Differentialdiagnose der Morquio's-
schen-Krankheit
M Schr. Kinderheilk. 117 (1969), 272-278
27. SPRANGER, J., TODT, H. und WIEDEMANN, H.-R.
Untersuchungen zur Zusammensetzung der Urin-
Mukopolysaccharide bei Kindern und Erwachsenen.
Clin. Chim. Acta 17 (1967), 142-146
28. STAHL, E. Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl.
Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York,
1967

29. SUSCHKE, J., VOGT, D. und SCHEIBE, P.
 Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung
 saurer Mukopolysaccharide im Harn.
 Fortschr. Med. 85 (1967), 911-912

30. SUZUKI, S., SAITO, H., YAMAGATA, T., ANNO, K., SENO, N.,
 KAWAI, J. and FURUHASHI, T.
 Formation of three types of disulfated disacchari-
 des from chondroitin sulfates by chondroitinase
 digestion.
 J. biol. Chem. 243 (1968), 1543-1550

31. TELLER, W. M. and ZIEMANN, A.
 Thin layer chromatography of urinary acid glycos-
 aminoglycans as screening procedure for muco-
 polysaccharidoses;
 in LEVINE, R.: Hormon- und Stoffwechselforschung,
 Vol. 1, p. 32-35
 G. Thieme Verlag, Stuttgart 1969

32. TELLER, W. Die Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im
 menschlichen Harn
 Mschr. Kinderheilk. 112 (1964) 538-546

33. WUSTEMAN, F. S., LLOYD, A. G. and DODGSON, K. S.
 Thin-layer chromatography and the rapid identifi-
 cation of common acidic glycosaminoglycans.
 J. Chromatog. 21 (1966), 32-39

34. YAMAGATA, T., SAITO, H., HABUCHI, O. and SUZUKI, S.
 Purification and properties of bacterial chondroi-
 tinases and chondrosulfatases.
 J. biol. Chem. 243 (1968), 1523-1535

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. Suschke gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und vor allem für die stets gewährte freundliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess danke ich für die Genehmigung, die Arbeit an der Kinderpoliklinik der Universität ausführen zu dürfen.

Herrn Dr. Bleckmann (Klinikum der FU Berlin) und Herrn Dr. Kresse (Universität Münster) danke ich für einige Vergleichssubstanzen.

Fräulein Schiener, die mir bei technischen Details stets behiflich war, danke ich ebenfalls.

Zuletzt sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft gedankt für die Übernahme der Materialkosten.

LEBENS LAUF

Am 26. Mai 1939 wurde ich in München als Sohn des Oberingenieurs Hans Rosenbeck und seiner Ehefrau Katharina, geb. Mayer, geboren.

In Fürstenfeldbruck besuchte ich fünf Jahre die Volksschule und trat 1951 an das hum. Gym. der Benediktiner in Schäftlarn über. Von dort wechselte ich 1957 an das Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg, wo ich 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Wehrdienst begann ich 1962 als Apothekerpraktikant die pharmazeutische Ausbildung, welche ich mit der Approbation als Apotheker beendete.

Seit dem Wintersemester 1968 studiere ich Medizin an der hiesigen Universität.

